



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Susumu KITANAKA, et al.

GAU:

SERIAL NO: 10/767,436

EXAMINER:

FILED: January 30, 2004

FOR: NOVEL DITERPEN COMPOUNDS

REQUEST FOR PRIORITY

COMMISSIONER FOR PATENTS  
ALEXANDRIA, VIRGINIA 22313

SIR:

- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number , filed , is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☐ Full benefit of the filing date(s) of U.S. Provisional Application(s) is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e):  
Application No. Date Filed
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
Japan	2003-201340	July 24, 2003

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. filed
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number  
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
- ☐ (B) Application Serial No.(s)  
☐ are submitted herewith  
☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,  
MAIER & NEUSTADT, P.C.  
Norman F. Oblon

  
Frederick D. Vastne

Registration No. 27,013

Customer Number

22850

Tel. (703) 413-3000  
Fax. (703) 413-2220  
(OSMMN 05/03)

Vincent K. Shier, Ph. D.  
Registration Number 50,552

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日            2 0 0 3 年   7 月 2 4 日  
Date of Application:

出 願 番 号            特 願 2 0 0 3 - 2 0 1 3 4 0  
Application Number:  
ST. 10/C]:            [ J P 2 0 0 3 - 2 0 1 3 4 0 ]

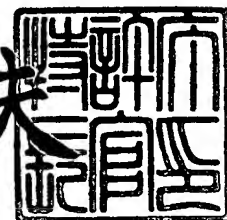
願            人            学 校 法 人 日 本 大 学  
Applicant(s):

CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

2 0 0 4 年   2 月 1 0 日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



BEST AVAILABLE COPY

出 証 番 号   出 証 特 2 0 0 4 - 3 0 0 8 3 5 1

【書類名】 特許願

【整理番号】 Y1K0562

【特記事項】 特許法第 3 0 条第 1 項の規定の適用を受けようとする特  
許出願

【提出日】 平成15年 7月24日

【あて先】 特許庁長官殿

【発明者】

【住所又は居所】 東京都千代田区九段南四丁目 8 番 2 4 号 学校法人日本  
大学内

【氏名】 北中 進

【発明者】

【住所又は居所】 東京都千代田区九段南四丁目 8 番 2 4 号 学校法人日本  
大学内

【氏名】 宮田 昇平

【発明者】

【住所又は居所】 中華人民共和国瀋陽市文化路 1 0 3 号 瀋陽薬科大学内

【氏名】 王 立岩

【発明者】

【住所又は居所】 中華人民共和国広東省深▲せん▼市高新技术産業園南區  
深▲せん▼精華大學研究院 C 區 7 樓 7 1 0 室 深▲せ  
ん▼中葯及天然葯物研究中心

【氏名】 王 乃利

【発明者】

【住所又は居所】 中華人民共和国広東省深▲せん▼市高新技术産業園南區  
深▲せん▼精華大學研究院 C 區 7 樓 7 1 0 室 深▲せ  
ん▼中葯及天然葯物研究中心

【氏名】 姚 新生

## 【特許出願人】

【識別番号】 899000057

【氏名又は名称】 学校法人日本大学

## 【代理人】

【識別番号】 100059959

【弁理士】

【氏名又は名称】 中村 稔

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100067013

【弁理士】

【氏名又は名称】 大塚 文昭

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100082005

【弁理士】

【氏名又は名称】 熊倉 禎男

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100065189

【弁理士】

【氏名又は名称】 宍戸 嘉一

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100074228

【弁理士】

【氏名又は名称】 今城 俊夫

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100084009

【弁理士】

【氏名又は名称】 小川 信夫

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100082821

【弁理士】

【氏名又は名称】 村社 厚夫

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100086771

【弁理士】

【氏名又は名称】 西島 孝喜

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100084663

【弁理士】

【氏名又は名称】 箱田 篤

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100114007

【弁理士】

【氏名又は名称】 平山 孝二

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008604

【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

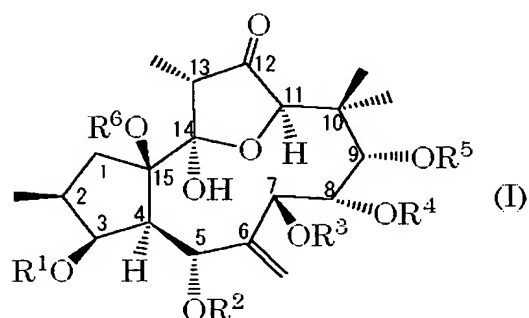
【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規なジテルペン化合物

【特許請求の範囲】

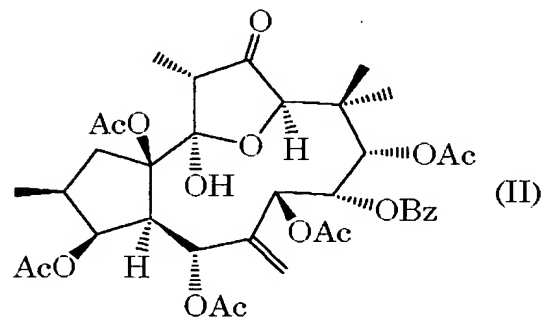
【請求項 1】 以下の一般式 (I) で表されるジテルペン化合物：



式中、

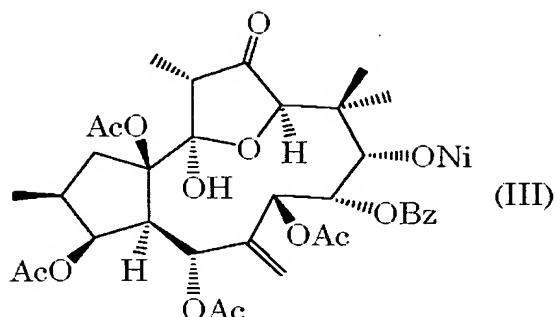
$R^1$ ないし $R^6$ は、同一又は異なっていてもよく、水素原子、直鎖若しくは分岐した、飽和若しくは不飽和の、置換若しくは未置換の脂肪族基、又は一般式 $RCO-$ で表される基を意味し、式中 $R$ は直鎖若しくは分岐した、飽和若しくは不飽和の、置換若しくは未置換の脂肪族基、置換又は未置換の芳香族基又はヘテロ芳香族基を表す。

【請求項 2】 以下の式 (II) で表される、請求項 1 に記載のジテルペン化合物：



式中、 $Ac$  はアセチル基を、 $Bz$  はベンゾイル基を表す。

【請求項 3】 以下の式 (III) で表される、請求項 1 に記載のジテルペン化合物:



式中、Ac はアセチル基を、Bz はベンゾイル基を、Ni はニコチノイル基を表す。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

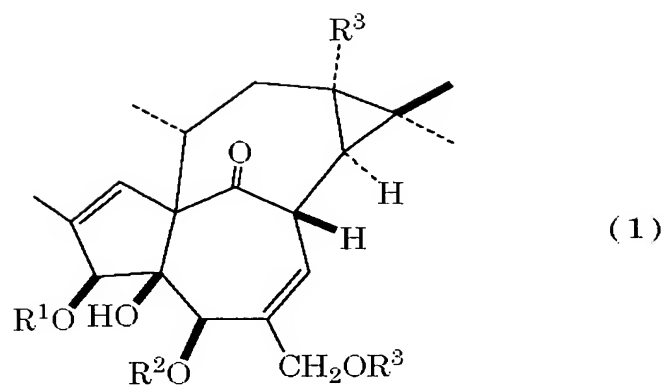
本発明は、抗悪性腫瘍剤として有用な、甘遂から単離された新規なジテルペン化合物に関する。

【0002】

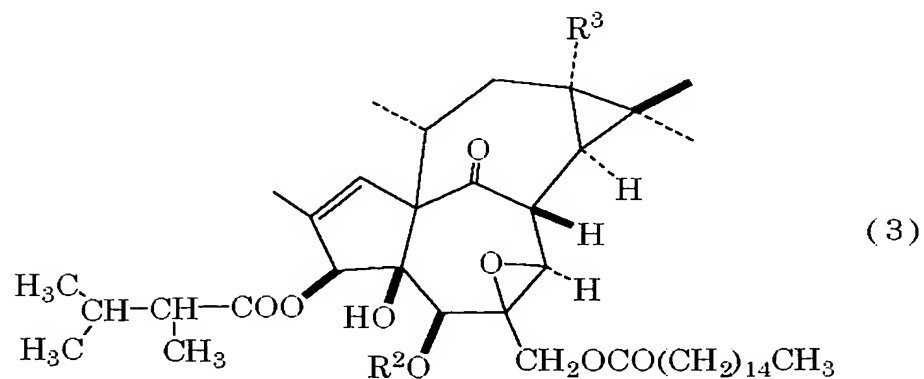
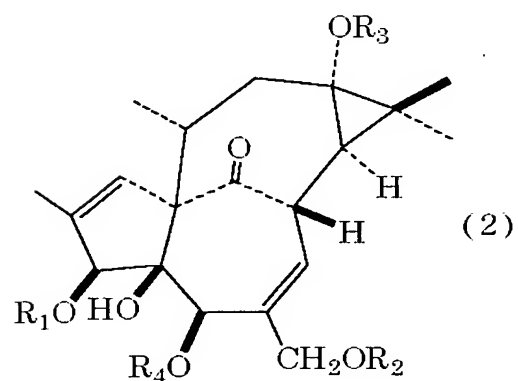
【従来の技術】

甘遂（学名：Euphorbia kansui L.）は、トウダイグサ科の多年生の植物で、中国北西部に分布する。中国では甘遂を慢性気管支炎、気管支喘息等のアレルギー疾患の治療に使用するほか、食道癌、乳腺癌などの悪性腫瘍の治療にも用いている。甘遂の成分研究は 1943 年頃から始められ、現在までに十数種類のジテルペン及びトリテルペンが見出されている。これらの成分のうちジテルペン化合物のいくつかに抗癌作用、抗ウイルス作用、細胞毒性作用があることが見出され、注目されている。

カプチャン (S. M. Kupchan) らは、Euphorbia esula L. から抽出した下記の式 (1) のインゲノール誘導体がマウスにおける P-388 リンパ性白血病に対する活性を有することを示している（非特許文献 1）。

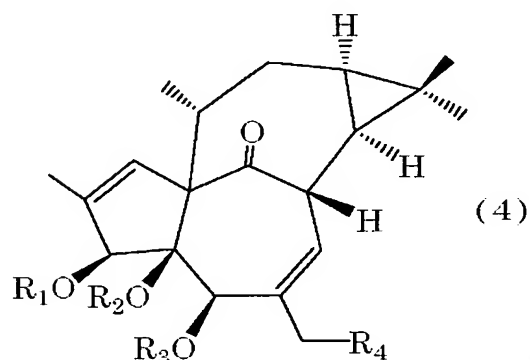


ウー (Tian-Shung Wu) らは、甘遂 (*Euphorbia kansui* L.) の根から抽出した  
 カンスイホリン A (下記の式 (2)) 及びカンスイホリン B (下記の式 (3))  
 が、インビボ (P-388) アッセイにより、活性を有することを示している (非特許文献 2)。





ブランコーモリナ (Magdalena Blanco-Molina) らは、以下の式 (4) のインゲノール誘導体がジュルカト (Jurkat) 細胞にアポトーシスを誘導することを記載している (非特許文献 3)。



しかしながら、いずれも本発明の化合物を開示していない。

#### 【0003】

##### 【非特許文献 1】

S. Morris Kupchan, et. al., Science, Vol. 191, pp. 571-572, 13, Feb., 1976

##### 【非特許文献 2】

Tian-Shung Wu, et. al., J. Nat. Prod., Vol. 54, No. 3, pp. 823-829, 1991

##### 【非特許文献 3】

Magdalena Blanco-Molina, et. al., Chemistry & Biology, 8/8, pp. 767-778, 2001

#### 【0004】

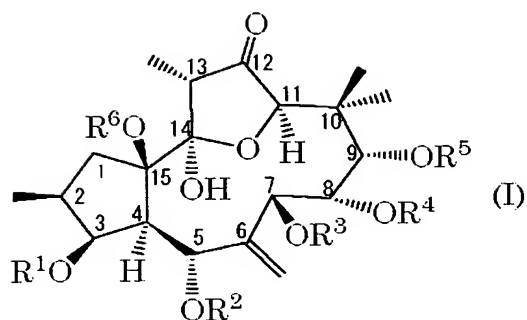
##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、抗悪性腫瘍作用を有する新規なジテルペン化合物を提供することである。

#### 【0005】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明の新規なジテルペン化合物は以下の一般式 (I) を有する。



式中、

$R^1$ ないし $R^6$ は、同一又は異なっているもよく、水素原子、直鎖若しくは分岐した、飽和若しくは不飽和の、置換若しくは未置換の脂肪族基、又は一般式 $RCO-$ で表される基を意味し、式中 $R$ は直鎖若しくは分岐した、飽和若しくは不飽和の、置換若しくは未置換の脂肪族基、置換又は未置換の芳香族基又はヘテロ芳香族基を表す。

一般式 (I) の化合物は、食道癌、乳腺癌などの悪性腫瘍の治療剤として使用することができる。

#### 【0006】

##### 【発明の実施の形態】

一般式 (I) の化合物の $R^1$ ないし $R^6$ における、脂肪族基としては直鎖若しくは分岐した、飽和又は不飽和の1～30の炭素原子を含む芳香族基が好ましく、1～16の炭素原子を含む脂肪族基がより好ましい。脂肪族基の置換基としては、ハロゲン原子、ヒドロキシル基、エーテル基、カルボニル基、カルボキシル基、アミノ基、アミド基を挙げることができる。

一般式 $RCO-$ で表される基が誘導されるもののカルボン酸のうち、 $R$ がアルキル基であるものとしては酢酸、プロピオン酸、酪酸、2,3-ジメチルブタン酸、カプリル酸、カプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸等の炭素原子数1～16の飽和脂肪酸、2,4-デカジエン酸のような炭素原子数1～16の不飽和脂肪酸等を挙げることができる。 $R$ が芳香族基であるものとしては、安息香酸、フタル酸、サリチル酸、アントラニル酸等の芳香族カルボン酸を挙

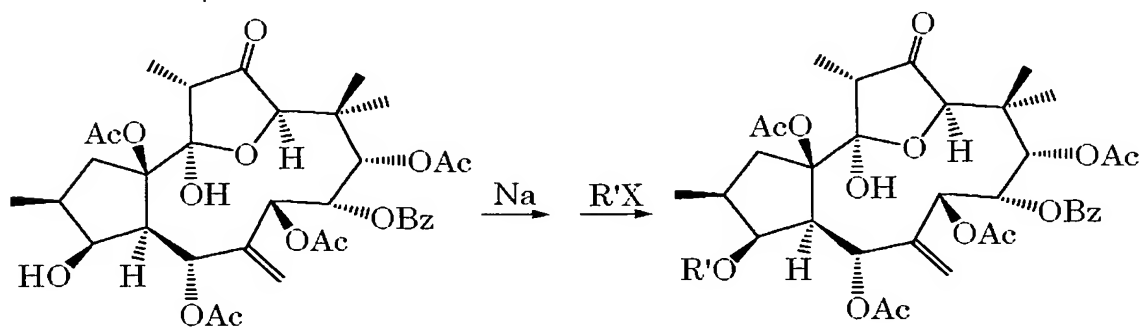
げることができる。Rがヘテロ芳香族基であるものとしては、フランカルボン酸、チオフェンカルボン酸、ピリジンカルボン酸、例えばニコチン酸、イソニコチン酸等のヘテロ芳香族カルボン酸を挙げることができる。芳香族基及びヘテロ芳香族基の置換基としては、ハロゲン原子、ヒドロキシル基、エーテル基、カルボニル基、カルボキシ基、アミノ基、アミド基を挙げることができる。

### 【0007】

本発明の一般式（I）において $R^1 \sim R^3$ 、 $R^5$ 及び $R^6$ がアセチル基、 $R^4$ がベンゾイル基である化合物（化合物5）及び $R^1 \sim R^3$ 及び $R^6$ がアセチル基、 $R^4$ がベンゾイル基、 $R^5$ がニコチノイル基である化合物（化合物8）は、甘遂の根をそのまま又は乾燥して、好ましくは粉碎し、有機溶媒（例えば、クロロホルム、酢酸エチル、ブタノール）で室温において抽出して得ることができ、得られた抽出物を自体公知の方法で処理し、精製することにより製造することができる。

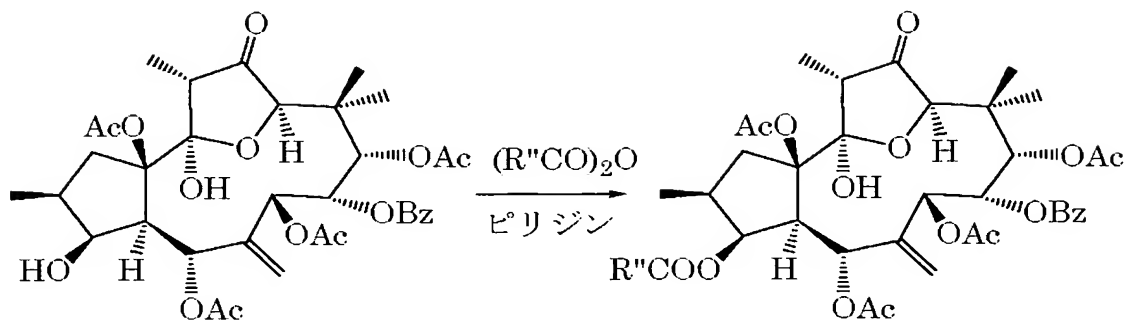
これらの化合物を出発原料として本発明の一般式（I）で表される他の化合物を製造することができる。

例えば、化合物5を加水分解して $R^1$ が水素原子である化合物を得、次いで該化合物を出発原料としてウィリアムソン合成を利用して、以下のようにナトリウムアルコキシドとハロゲン化アルキル（ $R'X$ ： $R'$ は $R^1$ と同じ意味を有し、 $X$ はハロゲン原子を表す）の反応により、本発明のエーテル化物を得ることができる。



また、 $R^1$ が水素原子である化合物を出発原料として、無水ピリジンの存在下に酸無水物（ $(R''CO)_2O$ ）と以下のように反応させることによって、本発明

のエステル化物を製造することができる。



### 【0008】

#### 【実施例】

##### 製造例 1

中国産の甘遂（学名：Euphorbia kansui L.）の根の乾燥品 15 kg を粉碎し、これを 60% エタノール水溶液（v/v）45 L に加えて、攪拌しながら室温で 12 時間浸漬した。浸漬を同一条件で 2 回繰り返す、得られた浸出液をあわせて減圧下に 40℃ で濃縮して 1200 g のエキスを得た。これを水 4 L に溶解し、クロロホルム、酢酸エチル及びブタノールの各 4 L で、順次それぞれ 3 回ずつ抽出した。これらの画分を減圧下で濃縮して、クロロホルム画分からは 165 g、酢酸エチル画分からは 23 g、ブタノール画分からは 64 g の濃縮エキスを得た。

クロロホルム画分から得られた濃縮エキス 150 g をシリカゲルカラム（Wako gel C-200、和光純薬社製、13×22 cm）にのせ、ヘキサン：酢酸エチル系の展開溶媒を使用し、酢酸エチル濃度を 0%、2%、3%、5%、10%、20%、30%、50% 及び 100% とした溶媒を順次使用して展開し、第 1～第 9 の 9 画分に分画した。

### 【0009】

##### 製造例 2

実施例 1 で得た第 6 画分（20% の酢酸エチルを含むヘキサン溶媒によって溶出した画分）を、逆相カラム（ODS-7515-12A、SSC 社製）により、水：メタノー

ル系の展開溶媒を使用し、水濃度を 7 0 %、5 0 %、4 0 %、3 0 %、1 0 % 及び 0 % とした溶媒を順次使用して展開し、第 1 ~ 第 6 の 6 画分に分画した。第 4 画分（水濃度 3 0 % のメタノール溶媒によって溶出した画分）を順相 H P L C により分離した。シリカゲルのカラム（Shenshu-PEGASIL SILICA-60-5、2 5 0 × 1 0 mm）を使用し、移動相としてクロロホルム：ヘキサン：酢酸エチル = 2 0 : 6 5 : 1 5 （v / v / v）を用い、流速 4 ml / min（室温）で溶出させ、溶出液を U V（2 5 4 nm）で監視しつつ、保持時間 1 5 分 5 7 秒及び 1 7 分 2 6 秒にピークを示す溶出液を分取した。これらの流出液を減圧下に濃縮して、化合物 3（収量 5 0 . 1 mg）及び化合物 4（収量 1 6 . 1 mg）を無色蠟燭状物質として得た。

### 【 0 0 1 0 】

#### 製造例 3

製造例 1 で得た第 6 画分（2 0 % の酢酸エチルを含むヘキサン溶媒によって溶出した画分）を、逆相カラム（ODS-7515-12A、SSC 社製）により、水：メタノール系の展開溶媒を使用し、水濃度を 7 0 %、5 0 %、4 0 %、3 0 % 及び 1 0 % とした溶媒を順次使用して展開し、第 1 ~ 第 5 の 5 画分に分画した。第 5 画分（水濃度 1 0 % のメタノール溶媒によって溶出した画分）を順相 H P L C により分離した。逆相カラム（Shenshu-PEGASIL、ODS 社製、2 5 0 × 1 0 mm）を使用し、移動相としてアセトニトリル：水 = 1 0 : 1 （v / v）を用い、流速 4 ml / min（室温）で溶出させ、溶出液を R I（shodex RI-101）で監視しつつ、保持時間 3 1 分 6 秒及び 3 7 分 1 2 秒にピークを示す溶出液を分取した。これらの流出液を減圧下に濃縮して、化合物 1（収量 1 2 . 1 mg）及び化合物 2（収量 1 0 . 1 mg）を無色蠟燭状物質として得た。

第 4 画分（水濃度 3 0 % のメタノール溶媒によって溶出した画分）を順相 H P L C により分離した。シリカゲルのカラム（Shenshu-PEGASIL SILICA-60-5、2 5 0 × 1 0 mm）を使用し、移動相としてクロロホルム：ヘキサン：酢酸エチル = 3 0 : 1 0 : 1 0 （v / v / v）を用い、流速 4 ml / min（室温）で溶出させ、溶出液を U V（2 5 4 nm）で監視しつつ、保持時間 8 分 3 0 秒及び 9 分 1 1 秒にピークを示す溶出液を分取した。これらの流出液を減圧下に濃縮して、化合物 3

(収量 14.0 mg) 及び化合物 4 (収量 1.3 mg) を無色蠟燭状物質として得た。

### 【0011】

#### 製造例 4

製造例 1 で得た第 7 画分 (30% の酢酸エチルを含むヘキサン溶媒によって溶出した画分) を、逆相カラム (ODS-7515-12A、SSC 社製) により、水:メタノール系の展開溶媒を使用し、水濃度を 70%、50%、40%、30% 及び 10% とした溶媒を順次使用して展開し、第 1~第 5 の 5 画分に分画した。

第 2 画分 (水濃度 50% のメタノール溶媒によって溶出した画分) の溶媒を蒸発させて結晶を得た。メタノールから再結晶して化合物 5 (200 mg) の白色針状結晶を得た。

第 1 画分 (水濃度 70% のメタノール溶液によって溶出した画分) を逆相 HPLC により分離した。カラムとして FluoFix (type: IEW205) を用い、移動相を 45% アセトニトリル (アセトニトリル:水=45:55 (v/v)) として流速 6.0 ml/min (室温) で溶出させ、溶出液を UV (210 nm) で監視しつつ、保持時間 11 分 0 秒及び 12 分 40 秒にピークを示す溶出液を分取した。それぞれの画分の溶媒を蒸発させ、メタノールから再結晶して、化合物 6 (20.0 mg) の白色粉末及び化合物 7 (10.0 mg) の白色針状結晶を得た。

第 3 画分 (水濃度 40% のメタノール溶媒によって溶出した画分) を HPLC により分離した。PEGASIL ODS-2 (SSC 社製、250×10 mm) カラムを使用し、移動相を 60% アセトニトリル (アセトニトリル:水=60:40 (v/v)) として流速 3 ml/min (室温) で溶出させ、溶出液を UV (210 nm) で監視しつつ、保持時間 26 分 3 秒にピークを示す溶出液を分取した。得られた画分の溶媒を蒸発させ、メタノールから再結晶して、化合物 8 (40.1 mg) の白色針状結晶を得た。

化合物 1 ないし化合物 8 の MS、UV、IR のデータを表 1 に、化合物 1 ないし化合物 4 の  $^1\text{H}$  NMR データを表 2 に、化合物 1 ないし化合物 4 の  $^{13}\text{C}$  NMR データを表 3 に、化合物 5 ないし化合物 7 の  $^1\text{H}$  NMR、 $^{13}\text{C}$  NMR データを表 4 に、化合物 8 の  $^1\text{H}$  NMR、 $^{13}\text{C}$  NMR データを表 5 に示す。

## 【 0 0 1 2 】

## 【表 1】

表 1 化合物 1 ないし化合物 8 の MS、UV、IR データ

化合物	1	2	3	4
性状	無色油状	無色油状	無色油状	無色油状
HR-MS (m/z)	FAB-	EI	EI	FAB+
実測値	685.43168	628.43401	482.30318	505.29259 (M+Na)
計算値	685.43152	628.43390	482.30320	505.29300 (C <sub>30</sub> H <sub>42</sub> O <sub>5</sub> +Na)
分子量	686	628	482	628
分子式	C <sub>40</sub> H <sub>62</sub> O <sub>9</sub>	C <sub>33</sub> H <sub>60</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>30</sub> H <sub>42</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>30</sub> H <sub>42</sub> O <sub>5</sub>
UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$	206 (2.88)	206 (2.88)	206 (4.11)	205 (4.01)
nm (lg $\epsilon$ )			220 (3.94)	220 (3.87)
IR $\nu_{\text{max}}^{\text{cm}^{-1}}$	3440 (OH)	3460 (OH)	3456 (OH)	3443 (OH)
	1742, 1725,	1741, 1728,	1720 (C=O)	1719 (C=O)
	1718 (C=O)	1716 (C=O)		

表 1 (続き)

	5	6	7	8
性状	白色針状結晶	白色粉末	白色針状結晶	白色針状結晶
HR-EI-MS (m/z)				
実測値	730. 28401	722. 25664	722. 25154	793. 29422
計算値	730. 28361	722. 25735	722. 25735	793. 29454
分子量	730	722	722	793
分子式	C <sub>37</sub> H <sub>46</sub> O <sub>15</sub>	C <sub>35</sub> H <sub>43</sub> O <sub>14</sub>	C <sub>35</sub> H <sub>43</sub> O <sub>14</sub>	C <sub>41</sub> H <sub>47</sub> NO <sub>15</sub>
UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{m}} (\lg \epsilon)$	230 (4. 00)	231 (4. 23)	230 (4. 21)	225 (4. 10)
IR $\nu_{\text{max}}^{\text{cm}^{-1}}$	3545 (OH)	3504 (OH)	3509 (OH)	3452 (OH)
	1738 (C=O)	1712 (C=O)	1741 (C=O)	1739 (C=O)
	1648 (C=C)	1650 (C=C)	1711 (C=O)	1652 (C=C)
			1651 (C=C)	



【0013】

【表2】

表2 化合物1ないし化合物4の<sup>1</sup>H NMRデータ(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS,  $\delta$  (ppm) (J=Hz))

化合物	1	2	3	4
H-1	6.01 d (1.5)	6.03 d (1.8)	6.07 d (1.5)	6.07 d (1.5)
H-3	5.44 s	5.35 s	5.53 s	5.48 s
H-5	3.88 d (6.9)	3.69 s	3.68 d (6.9)	3.68 brs
H-7	6.07 d (3.9)	5.71 m	5.77 m	5.76 m
H-8	4.06 dd (12.6, 4.5)	3.98 m	4.01 dd (11.7, 3.6)	4.01 dd (11.7, 3.6)
H-11	2.56 m	2.54 m	2.46 m	2.44 m
H <sub>2</sub> -12	2.72 dd (16.8, 3.3) 2.19 m <sup>b</sup>	2.70 dd (16.8, 3.3) 2.20 m <sup>b</sup>	2.26 m <sup>b</sup> 1.75 m <sup>b</sup>	2.26 ddd (15.9, 9.0, 3.3) 1.75 m <sup>b</sup>
H-13			0.67 m	0.67 m
H-14	1.23 m <sup>b</sup>	1.23 m <sup>b</sup>	0.90 m <sup>b</sup>	0.90 m <sup>b</sup>
Me-16	1.07 s	1.05 s	1.05 s	1.05 s
Me-17	1.19 s	1.18 s	1.08 s	1.08 s
Me-18	0.97 d (7.5)	0.97 d (6.6)	0.98 d (6.9)	0.98 d (6.9)
Me-19	1.78 d (1.5)	1.773 d (1.5)	1.79 m <sup>b</sup>	1.79 m <sup>b</sup>
H-20	4.73, 4.47 Abq (12.6)	1.777 s 3H	1.79 m <sup>b</sup>	1.79 m <sup>b</sup>
3-R <sub>1</sub>	2.31 m 1H 1.92 m 1H 0.92 d (6.9) 3H 0.96 d (6.6) 3H 1.14 d (7.2) 3H	2.31 m 1H 1.92 m 1H 0.92 d (6.9) 3H 0.96 d (6.6) 3H 1.14 d (7.2) 3H	2' 5.94 d (15.3) 3' 7.68 dd (15.3, 11.7) 4' 6.16 dd (11.7, 10.5) 5' 6.14 m <sup>b</sup> 6' 2.33 m 7' 1.43 m 8', 9' 1.29 m 10' 0.89 t (7.0)	2' 5.85 d (15.3) 3' 7.33 m 4' 6.19 m <sup>b</sup> 5' 6.19 m <sup>b</sup> 6' 2.15 m 7' 1.44 m 8', 9' 1.29 m 10' 0.89 t (7.0)
13-R <sub>3</sub>	2.19 t (7.5) 2H 1.55 m 2H 1.25 s -(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> - 0.88 t (6.9) 3H	2.19 t (7.5) 2H 1.55 m 2H 1.25 s -(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> - 0.88 t (6.9) 3H		
20-R <sub>2</sub>	20-COCH <sub>3</sub> 2.05 s 3H			

【0014】

【表3】

表3 化合物1ないし化合物4の $^{13}\text{C}$  NMRデータ (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)

C	1	2	3	4
1	131.1	131.6	132.8	132.8
2	135.8 <sup>b</sup>	135.3	135.8	135.8
3	82.4	82.8	83.4	83.4
4	84.3	84.4	85.2	85.2
5	74.6	76.2	77.6	77.6
6	135.9 <sup>b</sup>	137.2	137.6	137.6
7	127.9	122.7	124.3	124.3
8	42.6	42.5	43.6	43.6
9	204.6	205.1	207.1	207.1
10	71.7	71.6	72.2	72.3
11	37.5	37.8	39.1	39.1
12	35.0	34.9	31.4	31.4
13	68.8	68.8	23.3	23.3
14	28.2	28.4	23.5	23.5
15	30.2	30.3	24.2	24.2
16	22.4	22.4	28.7	28.8
17	16.6	16.7	15.7	15.7
18	18.2	18.0	17.4	17.4
19	15.5	15.5	15.8	15.8
20	66.3	21.9	22.2	22.2
3-R <sup>1</sup>				
1'	176.7	176.9	168.0	168.1
2'	46.3	46.3	120.1	118.2
3'	31.0	31.0	141.5	146.6
4'	20.6	20.6	126.4	128.4
5'	19.1	19.1	145.4	147.1
6'	14.06	14.06	31.6	33.2
7'			28.5	28.5
8'			29.2	31.6
9'			22.5	22.6
10'			14.2	14.2
20-R <sup>2</sup>				
1''	170.4			
2''	21.0			
13-R <sup>3</sup>				
1'''	173.4	173.5		
2'''	34.3	34.3		
3'''	24.7	24.7		
4'''	29.48	29.48		
5'''	29.48	29.48		
6'''	29.34	29.34		
7'''	29.22	29.22		
8'''	29.15	29.15		
9'''	29.10	29.11		
10'''	31.79	31.79		
11'''	22.60	22.60		
12'''	13.98	13.97		

<sup>b</sup> 割り当ては交換される可能性がある。

【0015】

【表 4】

表 4 化合物 5 ないし化合物 7 の  $^1\text{H}$  NMR、 $^{13}\text{C}$  NMR データ  
[(500 MHz and 125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS,  $\delta$  (ppm)) ( $J = \text{Hz}$ )]

position	7		6		5	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
1	4.93 s	83.4	4.32 d (3.9)	87.1	2.65 dd (6.4, 13.9)	40.3
2		80.0		78.3	2.20 m	
3	5.38 d (4.9)	79.7	5.54 d (4.9)	76.7	2.12 m	38.8
4	3.48 m	46.4	3.61 dd (11.3, 4.8)	45.1	5.58 m	74.4
5	5.95 s	74.3	5.91 m	73.8	2.97 brs	51.4
6		135.8		135.8	6.13 s	70.1
7	5.87 s	65.1	5.89 m	64.6	6.39 s	69.1
8	4.70 d (9.4)	72.5	4.65 d (9.2)	72.7	6.05 s	71.0
9		209.3		209.5	5.07 s	82.4
10		47.9		48.1		41.5
11	3.65 d (2.1)	61.2	3.69 d (2.2)	60.8	4.13 s	77.5
12	3.43 m	58.0	3.33 dd (2.4, 9.4)	59.0		214.0
13	3.26 m	41.6	3.93 m	42.6	2.28 q (6.5)	50.7
14		211.4		204.9		106.3
15		84.8		96.1		90.6
16	1.32 s	19.4	1.31 s	20.2	0.92 d (6.3)	13.3
17	6.31 s	127.9	6.52 brs	128.3	5.24 s	106.3
	5.91 s		5.94 brs		5.14 s	
18	1.33 s	21.6	1.34 s	21.6	1.29 s	18.6
19	0.85 s	18.9	0.85 s	19.0	1.14 s	22.1
20	1.66 d (6.4)	19.2	1.52 d (6.4)	17.0	1.30 d (6.5)	9.21
Acetyls			Acetyls		Acetyls	
CO-1		170.6	CO-15	172.4	CO-3, 15	169.5
COMe-1	2.13 s	20.3	COMe-15 2.31 s	21.3	COMe-3, 15	170.2
CO-3		169.8	CO-3	168.8	COMe-3, 15	22.0
COMe-3	1.95 s	20.6	COMe-3 1.89 s	20.4	COMe-5	21.3
					COMe-5	168.8
					CO-7	20.9
					COMe-7	170.3
					CO-9	21.1
					COMe-9	169.2
Benzoyls			Benzoyls		Benzoyls	20.4
CO-5		164.8		164.9	CO-8	165.4
COPh-1		128.3		128.3	COPh-8 1	130.1
5	2,6 7.48 m	129.1	7.55 m	129.3	2,6 8.03 m	129.9
	3,5 6.88 m	127.7	7.02 m	127.7	3,5 7.42 m	128.3
	4 7.09 m	132.6	7.22 m	132.8	4 7.53 m	132.9
CO-7		166.2		166.0		
COPh-1		128.6		128.4		
7	2,6 7.53 m	129.4	7.50 m	129.5		
	3,5 7.02 m	127.9	6.92 m	127.8		
	4 7.24 m	132.9	7.11 m	132.8		
OH-2	2.32 s		OH-2 2.52 s			
OH-8	3.53 d (9.4)		OH-8 3.54 d (9.4)			
OH-15	4.11 s		OH-1 3.92 d (3.9)			

## 【0016】

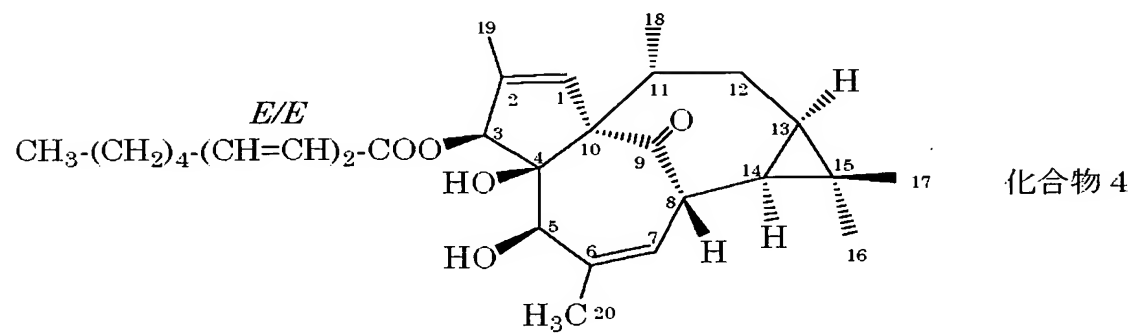
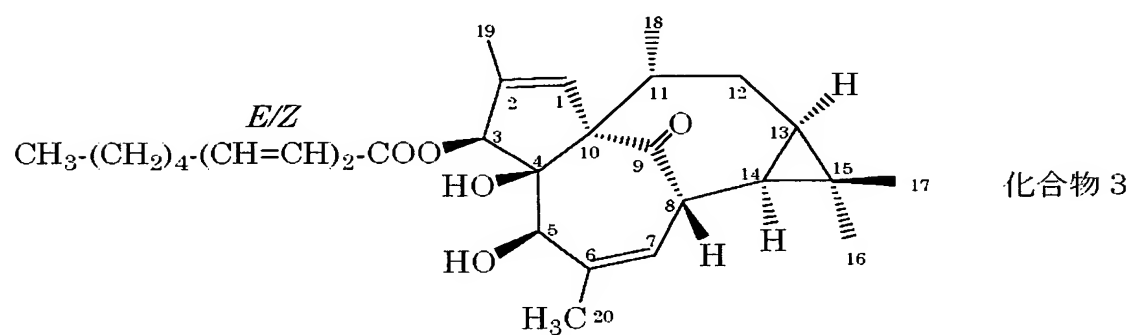
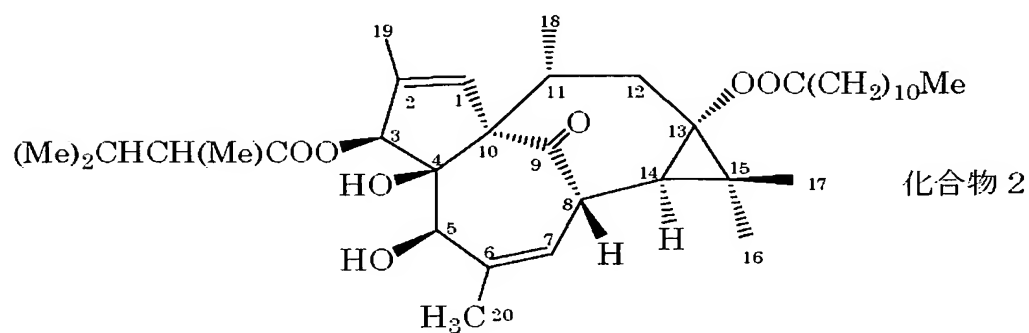
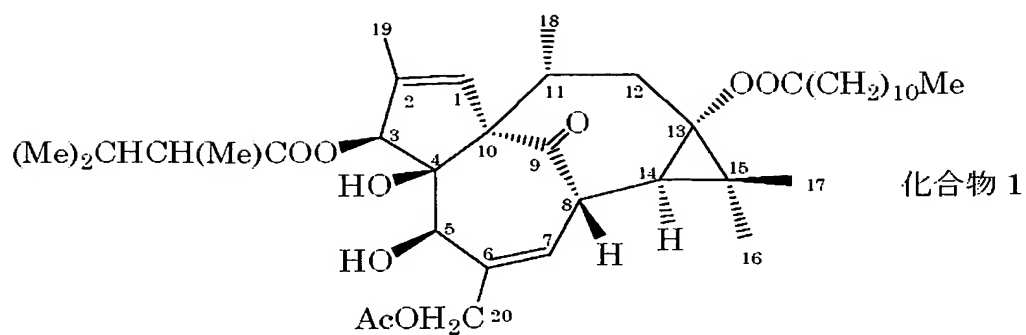
【表5】

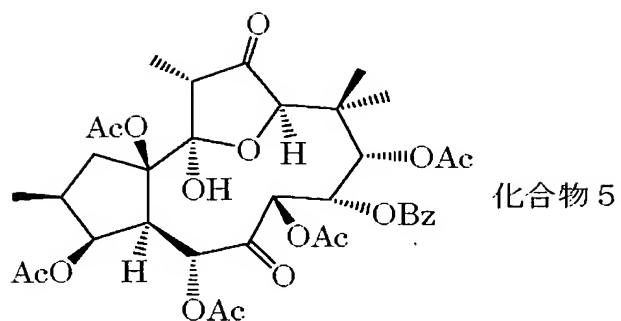
表5 化合物8の $^1\text{H}$ NMR、 $^{13}\text{C}$  NMRデータ (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)

8		
atom	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
1 $\alpha$	2.68 dd (4.5, 12.0)	39.9
1 $\beta$	2.19 m <sup>b</sup>	
2	2.20 m <sup>b</sup>	38.7
3	5.58 brs	74.1
4	3.05 d (2.7)	51.4
5	6.19 s	69.5
6		144.7
7	6.43 s	69.1
8	6.17 s	71.0
9	5.36 s	83.3
10		41.7
11	4.30 s	77.4
12		213.6
13	2.33 q (6.6)	50.9
14		106.4
15		90.5
16	0.92 d (6.0)	13.2
17a	5.17 s	109.9
17b	4.99 s	
18	1.21 s	22.1
19	1.40 s	18.7
20	1.32 d (6.5)	9.18
3-COMe	2.09 s	169.5
		21.2
5-COMe	1.95 s	168.3
		20.8
7-COMe	1.51 s	170.0
		20.3
15-COMe	2.00 s	168.8
		21.9
8-benzoyl		164.9
		129.7
	8.03 m	129.5
	7.41 m	127.8
	7.55 m	133.1
9-nicotinoyl	9.18 s	162.7
	8.77 d (4.2)	152.7
	8.31 d (7.8)	150.0
	7.39 m <sup>b</sup>	137.4
		125.0
		123.2

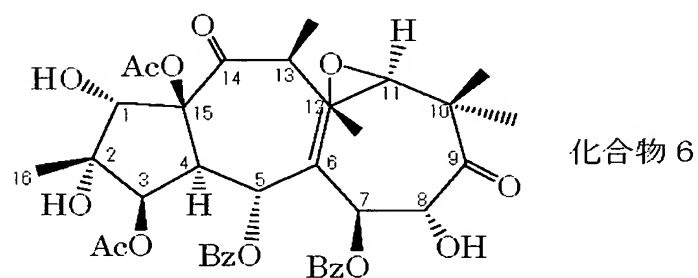
## 【0017】

以上のデータから、化合物1ないし化合物8は以下の構造式を有することが確認された。

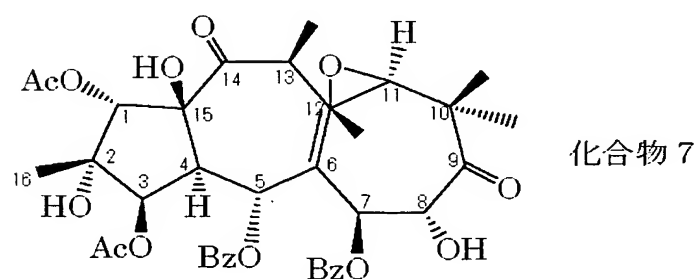




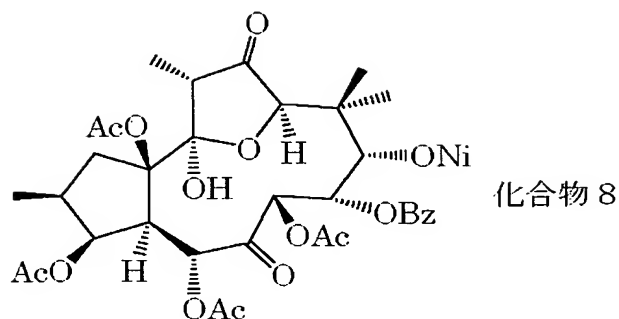
式中、A c はアセチル基、B z はベンゾイル基を表す。



式中、A c はアセチル基、B z はベンゾイル基を表す。



式中、A c はアセチル基、B z はベンゾイル基を表す。



式中、Acはアセチル基、Bzはベンゾイル基、Niはニコチノイル基を表す。

### 【0018】

本発明の化合物は細胞増殖を阻害する作用を有し、この作用を以下に述べるアニマルキャップアッセイ法によって確認した。アニマルキャップアッセイ法の詳細は、Godsave, S. F. and Slack, J. M. W. (1989年), Dev. Biol. 134: 486-490を参照。

アフリカツメガエルの胞胚後期のアニマルキャップ細胞をピンセットで培養液中に分離する。分離したアニマルキャップ細胞の動物極組織から細胞を分離し、培養液中に移して細胞分散液を調製する。

0.2 mg/mlの $\gamma$ -グロブリンを含む50%のアニマルメディウムを含むテラサキプレートに、得られた細胞分散液を入れる。本発明の化合物を10  $\mu$ g/ml含む溶液をテラサキプレートに加え、翌日顕微鏡で個々の細胞が分裂しているかどうかを観察した。阻害率は(分裂していない細胞の数) / (細胞の総数)である。結果を表6に示す。

表6 細胞分裂の阻害作用

化合物番号	阻害率 (%)
化合物 3	53.0%
化合物 4	55.1%

化合物の濃度は10  $\mu$ g/mlである。

### 【0019】

表6から明らかなように、本発明の化合物は細胞分裂の阻害作用を有すること

から、食道癌、乳腺癌などの悪性腫瘍の治療剤として有用である。

本発明の化合物を経口、非経口又は経皮投与することができる。投与量は成人一人の1日、体重1kg当たり0.1mg～100mgが適当である。

本発明の化合物を種々の剤形で投与することができ、例えば錠剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、注射剤、座剤、軟膏剤、パップ剤等の形態で投与することができる。本発明の化合物をこれらの剤形に形成する場合、これらの製剤化に通常使用する担体や添加物、例えば溶剤、基剤、希釈剤、充填剤などの賦形剤、溶解補助剤、乳化剤、分散剤、崩壊剤、可溶化剤、増粘剤、滑沢剤等の補助剤、抗酸化剤、保存剤、芳香剤、甘味剤等の添加剤を常法に従って使用し、製剤化することができる。

#### 【0020】

##### 【発明の効果】

本発明の化合物は、抗悪性腫瘍作用を有する新規なジテルペン化合物であり、抗悪性腫瘍剤として有用である。

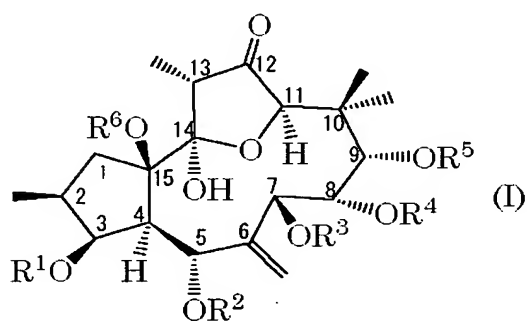


【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 抗腫瘍活性を有する新規な化合物を提供すること。

【解決手段】 本発明の新規な化合物は式（I）で表されるジテルペン化合物である。式中、 $R^1$ ないし $R^6$ は脂肪族基又は一般式 $RCO-$ で表される基を意味し、式中 $R$ は脂肪族基、芳香族基又はヘテロ芳香族基を表す。本発明の化合物は、甘遂（学名：Euphorbia kansui L.）の根から有機溶媒（クロロホルム、酢酸エチル、ブタノール）により抽出することができ、得られた化合物を出発原料として自体公知の方法に従って製造することができる。本発明の化合物は細胞増殖阻害作用を有し、抗悪性腫瘍剤として有用である。



【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 2 0 1 3 4 0

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 8 9 9 0 0 0 0 5 7 ]

1. 変更年月日	1 9 9 9 年 9 月 1 7 日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都千代田区九段南四丁目 8 番 2 4 号
氏 名	学校法人日本大学